



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

PROBLEMAS SOBRE LA REPRODUCCIÓN EN GANADO BOVINO: SÍNDROME
DE FREEMARTIN

REPRODUCTIVE PROBLEMS IN CATTLE: FREEMARTIN SYNDROME

Autor/es

M^a Asunción Lapuente Gracia

Director/es

Antonio del Niño Jesús García

Facultad de Veterinaria

Año 2016

ÍNDICE

Pgs.

1. Resumen	2
1.1 <i>Summary</i>	2
2. Introducción y justificación	3
2.1 Introducción	3
2.2 Justificación	6
3. Objetivos	17
4. Metodología	17
5. Resultados y discusión	18
6. Conclusiones	20
6.1 Conclusions	21
7. Valoración personal	22
8. Bibliografía	23
9. Anexos	28

1. RESUMEN

Problemas sobre la reproducción en ganado bovino: síndrome de Freemartin.

Revisión bibliográfica actualizada del síndrome de Freemartin, que es una de las diferentes anomalías reproductivas que se pueden presentar en la cría de ganado bovino, y trae como consecuencia la disminución en la eficiencia reproductiva y problemas en el rendimiento económico.

Esta patología es un tipo de infertilidad que afecta principalmente a las hembras nacidas, en aproximadamente, el 92% de los partos de gemelos macho-hembra, debido a la transferencia de células y/u hormonas del macho a la hembra causando grados variables de supresión del desarrollo del sistema reproductivo femenino y permitiendo el desarrollo de partes reproductivas masculinas, generando hembras con diferente grado de infertilidad.

El objetivo es conocer este síndrome en profundidad, es decir, su etiología, fisiopatología, distintos métodos de diagnóstico, así como su incidencia en explotaciones de ganado vacuno en cuanto a su repercusión económica y a nivel de fertilidad.

1.1. SUMMARY

Reproductive problems in cattle: Freemartin syndrome.

Updated bibliographic review of Freemartin syndrome, which is one of several reproductive abnormalities that may occur in the breeding of cattle, and results in the decrease of reproductive efficiency and problems in economic performance.

This pathology is a type of infertility that affects mainly females born in approximately 92% of twin births male-female, due to the transfer of cells and hormones of the male to the female causing varying degrees of the growth suppression in the female reproductive system and allowing the development of male reproductive parts, generating females with different degrees of infertility.

The target is to know in depth this syndrome, its etiology, pathophysiology, different diagnostic methods and their impact on cattle farms in their economic and fertility level.

2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

2.1. INTRODUCCIÓN

¿Qué es el *Síndrome de Freemartin* o *quimerismo*?

El *Freemartinismo*, descrito por primera vez en 1779, es una de las dos formas más severas de anomalía congénita que causa infertilidad en la hembra bovina producto de una concepción gemelar de dos embriones de distinto sexo (Hunter, 1995).

El desarrollo de los órganos reproductivos femeninos se ve suprimido en diferentes grados, dando paso al desarrollo del tracto reproductivo masculino y de un fenotipo generalmente masculinizado (Brace et al., 2008).

Los individuos *freemartin* son el resultado de la anastomosis de los vasos placentarios (Foto 3), alrededor del día 39 de gestación, que conlleva a una circulación común entre los embriones que permite que la diferenciación sexual del macho, anterior a la de la hembra, interfiera con el desarrollo normal del tracto reproductivo de ésta (Moncaleano et al., 2006).

El fenotipo puede diagnosticarse mediante un examen de fusión de membranas placentarias o un examen físico simple a partir del momento del nacimiento [clítoris engrandecido, profundidad vaginal y pelo extravulvar entre otros (Foto 4)], o un examen de sangre en el que se determina la presencia de células XX y XY en la hembra, como indicador definitivo de la enfermedad.

Como resultado nacerán terneras *freemartin*, hembras estériles que presentan un grado variable de masculinización de su tracto genital observándose aplasia o hipoplasia de los órganos del aparato reproductivo (Jiménez y Sánchez, 1999; Hinrichs, 1999; Petrizzi, 2002, entre otros autores); de manera que, los ovarios son más pequeños, el útero está poco desarrollado, los conductos deferentes, vesículas seminales y la próstata pueden incluso estar presentes (Foto 5) (Rodríguez, 2013).

En el *freemartin* hay algunos signos clínicos especialmente concernientes a los órganos genitales, sin embargo, algunas veces la apariencia de los órganos genitales externos de la ternera recién nacida es relativamente normal (Ayala et al., 2007).

En terneras de aproximadamente 1 año de edad, se puede establecer la marcada disminución en el desarrollo de la vagina, cérvix, útero y gónadas. En los animales más jóvenes donde es imposible el examen rectal, se debe insertar un tubo-prueba lubricado vía vaginal, en terneras de 3 - 6 semanas de edad la longitud de la vagina en las *freemartins* es de 7.4 ± 2.5 cm. En terneras normales de la misma edad esta longitud es de 14 ± 2.8 cm. En una vaca la longitud normal de la vagina es de 30 cm., mientras en una *freemartin* sólo es de 8 - 10 cm. y la examinación rectal confirmará la ausencia de cérvix. Algunas veces la *freemartin* presenta elongación del clítoris y una borla de pelos en la comisura inferior de la vulva, características inconsistentes no muy confiables (Ayala et al., 2007).

En general, los genitales externos de las terneras *freemartins* son predominantemente femeninos, con un clítoris aumentado de tamaño y una distancia ano-genital también aumentada. Estos ligeros caracteres masculinos se deben a los andrógenos circulantes, bien procedentes del testículo del gemelo macho o del tejido testicular de la gónada *freemartin*. La disposición de los conductos internos es variable dependiendo del grado de regresión de los conductos paramesonéfricos y del desarrollo de los mesonéfricos. El desarrollo de los conductos masculinos es más acentuado en las proximidades de las gónadas, debido a la producción de andrógenos por las células intersticiales del tejido testicular de la gónada *freemartin* invertida (Noden, 1990).

Además se han reportado casos de quimeras nacidas de parto simple como consecuencia de la muerte de su hermano gemelo después de que se ha establecido la anastomosis vascular (Wijeratne et al, 1977).

En los gemelos machos se ha observado una baja calidad espermática y reducción de la fertilidad o esterilidad (Lui et al., 1987; Greene et al., 1997) debida a la persistencia del ducto paramesonéfrico y a la falta de desarrollo de la *rete testis* y los túbulos seminíferos (Virgier et al., 1984).

Se debe tener claro que el quimerismo no se restringe a las células sanguíneas, también pueden encontrarse células XY en otros órganos y tejidos como riñón, pulmón, médula ósea y tejido conectivo del animal *freemartin* (Makinen, 1974; Lui et al., 1987).

A pesar de ser una generalidad en ganado de leche, puede ser benéfico para la producción de dos vacas en vez de una, a pesar de que si no se diagnostica una hembra *freemartin* a tiempo, el criador aumentará sus costos de producción, alimentación, tiempo y manejo de esa hembra infértil que no puede ser utilizada con fines reproductivos. El *freemartinismo* representa un factor de pérdidas económicas considerable en la producción ganadera, si se tiene en cuenta que la incidencia de gemelaridad es de 0.5% (1 par de gemelos por cada 227 nacimientos) en ganado de carne y 1.04% (1 par de gemelos por cada 96 nacimientos) en ganado de leche (Lyon, 1995). De esos nacimientos entre el 0.5 - 1.0% son gemelos de diferente sexo los cuales dan origen a hembras *freemartin* en el 90% de los casos.

El efecto del número de partos en la tasa de gemelación no se entiende con claridad pero se puede explicar por un mayor porcentaje de hembras de más edad que soportan gemelos durante la gestación, un aumento en la tasa de doble ovulación o una interacción de ambos factores. (Fricke et al., 1998).

La causa del *Freemartinismo* no está clara y hasta el momento se han postulado dos teorías. La *teoría hormonal* propone que las células intersticiales de las gónadas del feto macho se desarrollan más temprano que las de la hembra y las hormonas masculinas al pasar al interior de la hembra, afectan los genitales antes de que ella secrete sus propias hormonas, las cuales son necesarias para su diferenciación (Salisbury y Lodge, 1978).

Por otro lado, la *teoría celular*, plantea que las células germinales primordiales del macho, se transfieren a través de los vasos placentarios anastomosados, previniendo el desarrollo de los ovarios (Salisbury y Lodge, 1978). También se ha reportado la transferencia de las células sanguíneas por la misma vía (Rice et al., 1970).

Ambas teorías, actualmente tienen objeciones prácticas, la *hormonal* tiene en contra el hecho que al inyectar andrógenos a una vaca preñada, no se altera el desarrollo del ovario fetal (Mason et al., 1958; Jost et al., 1963; Jainudeen y Hafez, 1965), pero se puede masculinizar el feto. La *teoría celular* tiene como principal objeción no haber demostrado la presencia de células XX en macho (López y Márquez, 1997).

2.2. JUSTIFICACIÓN

A lo largo de este apartado del trabajo se realiza un análisis de las diferentes maneras de identificar animales *freemartin* y una revisión de varios estudios que tratan de justificar las dos teorías de la causa de la patología.

DIAGNÓSTICO DE ANIMALES FREEMARTIN

Teniendo en cuenta el efecto adverso que tiene la circulación placentaria común entre gemelos de diferente sexo, el diagnóstico de bovinos con quimerismo cromosómico es de especial interés para los productores de leche, debido a que esto permite proceder a la eliminación de los animales estériles o subfértiles, mientras que en las explotaciones de cebo el diagnóstico debe realizarse para decidir el destino de los animales (Jiménez, 2000).

La identificación de una hembra *freemartin* se realiza mediante la aplicación de métodos diagnósticos que van desde el examen clínico hasta pruebas moleculares de identificación de ADN. En más del 80% de los casos, animales normales y *freemartin* pueden ser diferenciados tras el nacimiento con base en los hallazgos de un examen clínico mediante palpación rectal. Sin embargo, hay una gran variabilidad en la estructura anatómica del tracto reproductivo de las hembras *freemartin*, que puede ir desde un fenotipo femenino de conformación corporal aparentemente normal, con vagina ciega o un poco más corta de lo normal, estructuras uterinas y ovarios, hasta acercarse a un fenotipo totalmente masculino con presencia de prepucio primordial, hemipene o testículos (Peretti et al., 2008).

Cuando el grado de masculinización es muy extenso, el desarrollo del tejido testicular produce cantidades suficientes de hormona masculina, para generar algunas características secundarias y comportamiento sexual masculino, produciendo hembras que son comúnmente utilizadas para detectar celo (Ayala et al., 2007).

Existe también una prueba serológica que, aunque es poco utilizada, se fundamenta en el hecho de que si se produce la anastomosis vascular los gemelos tendrán poblaciones de eritrocitos procedentes de dos tipos de células precursoras, cada una con diferentes antígenos de superficie; tal intercambio sanguíneo durante el desarrollo embrionario temprano genera tolerancia inmunológica (James y Dove, 1996); y aunque no hay producción de anticuerpos contra las células del hermano gemelo, sus antígenos de superficie pueden ser detectados por pruebas hemolíticas utilizando marcadores de grupos sanguíneos específicos.

Estas pruebas solo pueden ser realizadas después de que los portadores tienen un mes de edad, ya que la maduración antigénica de los glóbulos rojos puede no ser completa hasta entonces (Long, 1990).

En una evaluación citogenética, el examen cromosómico tiene un 98% de probabilidades de éxito y, puede realizarse desde el momento mismo del nacimiento de la ternera. La presencia de células tanto XX como XY en la sangre, establece que hubo anastomosis vascular entre los gemelos y se asume que la hembra en cuestión, es un animal *freemartin* (Jiménez, 2000).

El desarrollo de pruebas moleculares como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso de secuencias específicas de ADN del cromosoma Y, constituyen un significativo avance en la detección del *freemartinismo*, en especial cuando se presenta una ternera que tiene pocas células con complemento cromosómico XY, ya que la PCR es un método *in vitro* altamente sensible que permite producir grandes cantidades (millones o billones) de copias exactas de un fragmento de ADN específico de longitud definida a partir de pequeñas cantidades de ADN. Esta técnica permite detectar la presencia de alelos relacionados con la determinación sexual en el ADN del individuo afectado, ofreciendo una alta confiabilidad, dado que puede detectarse la presencia de una secuencia en una célula afectada dentro de la muestra (Valencia et al., 2009).

Por otra parte, las técnicas de citogenética han sido mejoradas con el uso de moléculas de ADN marcadas con diversos fluorocromos y la posibilidad de que cualquier fragmento individual de ADN pueda ser revelado en células en metafase e interfase por hibridación *in situ* por fluorescencia (Moreno et al., 2007).

En cuanto a las nuevas líneas de investigación cabe citar la detección del DNA fetal en la sangre de la madre, para diagnósticos precoces (durante la gestación) del *freemartinismo*, así como el estudio de las propiedades antitumorales de la sustancia inhibidora mülleriana (SIM) (Padula, 2005).

ESTUDIOS REALIZADOS

Los factores que alteran los mecanismo de la diferenciación sexual son múltiples y su estudio anatomopatológico, citogenético y molecular está permitiendo una mejor comprensión de la diferenciación sexual normal y sus anormalidades (Salamanca, 1992).

A continuación se muestran varios estudios realizados por distintos autores que tratan de explicar la etiología del *Síndrome de Freemartin*.

Mediante el análisis de los tres estudios podemos observar que existen distintas técnicas para el diagnóstico de hembras bovinas *freemartins*, de manera que podemos aplicarlas desde el mismo momento del parto y eliminar estos animales para evitar pérdidas económicas al productor, sobre todo, en granjas dedicadas al ganado lechero.

- 1. DETECCIÓN DE QUIMERISMO CELULAR EN FREEMARTIN POR BANDEO RBG
Juan B. López O.; María E. Márquez F.; Edna J. Márquez F., 1999.

Se tomaron muestras de sangre periférica heparinizada de cada uno de los gemelos de distinto sexo en cinco casos evaluados. Los linfocitos fueron cultivados y estimulados con Fitohemaglutinina a 37°C en medio F-12 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina. El mismo procedimiento fue utilizado para cultivar linfocitos de animales normales de ambos sexos que fueron usados como control.

Se utilizó el bandeo RBG para determinar los patrones de replicación de los cromosomas sexuales bovinos y explorar su utilidad en la determinación de quimerismo XX/XY en la sangre periférica de los gemelos de diferente sexo. Para el efecto, se utilizó marcaje terminal con 5-Bromo-2-Deoxiuridina (20 µg/ml) durante 6 horas y se adicionó Colcemid (0.07 µg/ml) al medio de cultivo, 30 minutos antes de procesar las muestras. Para la obtención de extendidos cromosómicos cada cultivo se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se sometió a tratamiento hipotónico con Citrato de sodio (0.024 M) a 37°C por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 200 x g durante 7 minutos.

Luego se descartó el sobrenadante, se fijó con Metanol-Ácido acético fresco (3:1) y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente.

El lavado de la muestra con fijador, el goteo en las placas y la coloración de las preparaciones cromosómicas se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por López, Márquez y Hoyos en 1997.

El análisis microscópico se hizo con ayuda de un objetivo de inmersión 100X. Para la evaluación del quimerismo se determinó la presencia de mitosis XX y XY en un rango de 183 a 300 mitosis de acuerdo con el índice mitótico obtenido en cada individuo.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran el número y porcentaje de mitosis XX y XY en las cinco parejas de gemelos heterosexuales evaluados en el presente estudio.

TABLA 1

CASOS	Gemelos I		Gemelos II		Gemelos III		Gemelos IV		Gemelos V		CONTROL	
SEXO	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
FENOTIPICO	&	%	&	%	a	%	&	%	ra	%	a	o
ICO					&				&		&	%
No. de Mitosis analizadas	300	300	270	210	300	230	183	294	300	300	100	100
Sexo Genético	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY	XX XY
No. Células	103	197	7	293	150	120	10	200	180	120	30	200
% Células	34.3	63.7	3.5	96.5	55.5	44.5	4.7	95.3	60.0	40.0	13.0	87.0
% Células	34.3	63.7	3.5	96.5	55.5	44.5	4.7	95.3	60.0	40.0	13.0	87.0
% Células	34.3	63.7	3.5	96.5	55.5	44.5	4.7	95.3	60.0	40.0	13.0	87.0

Datos obtenidos de 5 casos de gemelos biovulares de distinto sexo que exhibían fenotipo *freemartin*.
López et al., 1999.

El marcaje terminal con BrdU muestra un patrón de bandas para cada par homólogo. En las mitosis XX, los cromosomas X son los de mayor tamaño y uno de ellos se presenta totalmente pálido o con una banda oscura en la parte media del brazo largo (Figura 1). Esto demuestra que uno de los dos X de hembras de bovino, se replica en la parte terminal de la fase S, es decir, presenta replicación tardía lo cual estaría en contra de los conceptos de Giannelli (1970), quien sugiere que los dos cromosomas X de vaca comienzan su replicación al principio de la fase S.

El cromosoma Y es uno de los más pequeños del genoma bovino, en el que el brazo corto se visualiza como una sola banda oscura (Figura 1), lo cual evidencia replicación temprana y el brazo largo se observa como una sola banda clara indicativo de replicación tardía.

La técnica de bandeo RBG utilizada permite la evaluación rápida de células XX y XY debido a que el patrón replicativo característico de los cromosomas sexuales permite diferenciarlos fácilmente sin necesidad de tener destreza en la evaluación de cariotipos. Por lo tanto, permite el conteo rápido de un número grande de mitosis requeridos para la detección de quimerismo críptico.

Los resultados obtenidos muestran que en los cinco casos estudiados, ambos gemelos presentan quimerismo XX/XY. Claramente se observa variabilidad en el porcentaje de células XX en los machos (2.0-16.0%) y de células XY en las hembras (22.8-63.7%) siendo el quimerismo mayor en estas últimas (Tabla 1). Este resultado podría explicar la variabilidad en el grado de masculinización en *freemartin*.

A pesar de que los resultados obtenidos en este estudio muestran un mayor quimerismo XY en la sangre periférica de las hembras de los casos estudiados, comparada con el porcentaje de células XX del macho, los autores no consideran que este número de casos sean suficientes para afirmar que esta observación sea un fenómeno generalizado en todos los eventos de gemelos *freemartin* que puedan ocurrir. Por lo tanto, se requiere evaluar un mayor número de gemelos antes de plantear una hipótesis al respecto.

En el presente trabajo se detectó quimerismo en la sangre periférica de ambos gemelos heterosexuales. Resultados similares fueron reportados para 129 nacimientos en los que se detectó quimerismo XX/XY en 124 hembras y 93 machos (Marcum, 1974).

La presencia de quimerismo en ambos gemelos de distinto sexo evidencia el flujo de células en ambos sentidos, entre los fetos. Esta evidencia contrasta con la creencia de que existe un flujo unilateral de células del macho a la hembras debido a que no se han detectado células XX en la gónada masculina.

El porqué no existe este quimerismo en la gónada masculina podría deberse más bien a un problema de muestreo en el que no se detectó quimerismo críptico. Este planteamiento está basado en el hecho de que las células del sistema hematopoyético y las células del aparato genital interno tienen el mismo origen embriológico en el mesodermo (Michel y Schwarte, 1970).

Si el intercambio celular se da a nivel mesodérmico y antes de que se forme el testículo, no existe razón para pensar que un tejido presente el quimerismo y el otro no, siendo que ambos tienen el mismo origen.

Una explicación alternativa es que la formación del testículo se dé antes del intercambio celular entre fetos, lo cual explicaría la ausencia de células XX en la gónada masculina.

El quimerismo XX/XY en sangre periférica en *freemartin* refleja su importancia en el origen de esta anomalía congénita y su utilidad como marcador celular de diagnóstico citogenético de *freemartinismo*.

La importancia práctica de este trabajo es mostrar que la detección de la presencia de quimera celular XX/XY en ambos gemelos a nivel prenatal o a temprana edad, daría luces al criador sobre las estrategias a seguir en el manejo de estas hembras, las cuales pueden generar costos económicos de sostenimiento y reproducción que podrían ser considerados más bien pérdidas en la producción.

- 2. QUIMERISMO LEUCOCITARIO EN HEMBRAS BOVINAS NACIDAS DE PARTO GEMELAR HETEROSEXUAL

Moncleano, J.S.; Jiménez, L.M.; Sánchez, C.A., 2006.

Se tomaron muestras de sangre con anticoagulante Liquemine® 5000 UI/ml de tres novillas de tres años y dos terneras de una y tres semanas de edad (tabla 2).

TABLA 2

Código	Raza	Edad	Descripción	Herramienta diagnóstica	Procedencia
0204	Holstein	3.5 años	Muñón uterino, vagina de 7 cm., ausencia de útero, cuernos y ovarios.	Palpación, Vaginoscopia Ultrasonido	Sopó (Cundinamarca)
0304	Normando	3 años	Órganos del tracto reproductivo pequeños. Ausencia de cerviz. Arthrogriposis miembros anteriores.	Palpación	Sopó (Cundinamarca)
0404	Gyr x Criollo	3 años	Hiperplasia de clítoris. Vagina de 3 cm. Ausencia de cervix. Posibles ovotestes	Palpación	Espinal (Tolima)
0504	Holstein	3 semanas	*	*	Cundinamarca
0704	Holstein	1 semana	*	*	Cundinamarca

*Servicio externo, no hay datos

Resumen de los signos clínicos.
Moncaleano et al., 2006.

Los ejemplares fueron remitidos al laboratorio, donde se realizó el cultivo de linfocitos para el análisis cromosómico. La siembra se realizó con la técnica estandarizada previamente por Jiménez (2000) para la obtención de metafases en bovinos colocando 2 ml de sangre completa con 8 ml de medio de cultivo celular RPMI 1640, 0.3 ml de Phitoheماغlutinina P y 1 ml de Suero Fetal Bovino 20%. Se incubó durante 67 horas a 38.5°C.

Uno de los cultivos de cada animal se expuso durante 7 horas a 0.3 ml de Bromodioxiuridina (BrUd), y todos a Colchicina (0.016%), 0.2 ml una hora antes de la extracción. Luego se transfirieron a tubos de punta cónica para ser centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se sometió a las células a solución hipotónica precalentada (KCl 0.075M), 8 ml por 30 minutos a 38.5°C. Se realizó una prefijación colocando 8 gotas de Camoy fresco, se homogenizó y centrifugó nuevamente por 10 minutos a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante y se fijó en Camoy por 30 minutos a 4°C. Finalmente se llevaron a cabo de 3 a 5 lavados con Camoy fresco hasta obtener botones celulares limpios.

La concentración celular de cada cultivo se dejó caer sobre láminas congeladas y húmedas, fijadas con calor, rotuladas y secadas a temperatura ambiente. Se realizó la coloración tradicional con Giemsa y diferencial (bandas G, R y C) con láminas de 2 a 7 días de envejecimiento.

Los micropreparados se examinaron con microscopio de luz brillante bajo un aumento de 10X y 100X, observándose las metafases, analizando el número cromosómico, estructura y morfología cromosómica en cada uno de los complementos bovinos muestreados.

RESULTADOS

Al análisis cromosómico, de las cinco hembras bovinas, cuatro presentaron quimerismo sexual leucocitario 60XX/60XY (Figura 2).

La proporción de la línea celular XY hallada en las terneras 0304, 0504 y 0704 fue de 0%, 7.09% y 33.33% con un 100%, 92.9% y 66.66% de células XX, respectivamente, siendo la novilla 0304 en la que no se detecta presencia de células XY, la ternera 0504 la que presentó el menor porcentaje de células XY, y la ternera 0704 la del mayor número de células XY (tabla 3).

Las otras dos novillas: 0204 y 0404, tuvieron porcentajes celulares XY de 12.08% y 29.78% con 87.91% y 70.21% de células XX, respectivamente. La condición fenotípica y el grado de subdesarrollo de los órganos del tracto reproductivo en estas dos terneras fueron semejantes (tabla 2 y 3).

TABLA 3

Código	Raza	Número de Metafases	60,XX %	60,XY %	Diagnóstico
0204	Holstein	91	87.91	12.08	Quimerismo Sexual leucocitario
0304	Normando	104	100	-	Inserción heterocromática Región intermedia brazo largo (1q) del cromosoma 1
0404	Gyr x Criollo	94	70.21	29.78	Quimerismo sexual leucocitario
0504	Holstein	141	92.9	7.09	Quimerismo sexual leucocitario
0704	Holstein	120	66.66	33.33	Quimerismo sexual leucocitario

Resultados del estudio citogenético.
Moncaleano et al., 2006.

- 3. IDENTIFICACIÓN ANATÓMICA, CITOGÉNICA Y MOLECULAR DE UN CASO DE SÍNDROME DE FREEMARTIN

Valencia F.J.; Johnson F.; Duque A.M., 2009.

Las muestras se obtuvieron a partir de tres animales (un par de hermanos gemelos y una hembra control), mantenidos en estabulación.

La descripción anatómica se realizó mediante evaluación física de los animales considerados, a los que se les inmovilizó para realizar una palpación externa de los órganos, así como de la profundidad de las estructuras vaginales. Se hizo registro fotográfico de la anatomía. Las estructuras del aparato reproductor de la hembra se compararon con hembras con fertilidad probada.

Para la evaluación cariotípica se hizo cultivo siguiendo el protocolo de López et al., 1997 y se continuó con la técnica de citogenética convencional para el análisis cromosómico descrito por Moorhead (1960).

RESULTADOS

Durante la exploración anatómica de la hembra considerada como *freemartin*, se pudo evidenciar la presencia de una distancia anogenital anormal de unos 32 cm (foto 1), distancia que es superior a la encontrada en una hembra normal que es cercana a los 2.5 cm, la profundidad del conducto vaginal no superó los 2.5 cm y la abertura de la vulva tuvo una longitud de 1.9 cm, el orificio de entrada a la vagina no presentó labios vulvares definidos, ni clítoris pero si mostró un penacho de pelo grueso a nivel ventral, su contextura general externa mostró una apariencia masculinizada similar a la de su hermano gemelo.

La evaluación del cariotipo de los individuos muestreados, mostró en la hembra considerada como *freemartin*, un quimerismo celular conformado por mitosis con cromosomas X y Y (foto 2), igualmente en el macho se pudo establecer la presencia en extendidos cromosómicos de mitosis con un par de cromosomas X, en la hembra utilizada como control no se evidenció la presencia de mitosis con cromosoma Y.

La evaluación de las pruebas con ADN de la hembra considerada como *freemartin*, mostró la amplificación de las regiones: SRY con tamaños cercanos a las 400 pares de bases y ZFX con tamaños cercanos a las 200 pares de bases, de igual forma se presentó para el macho. La hembra control solo presentó la amplificación de la región ZFX.

Como conclusión cabe añadir que es importante realizar alguna de las técnicas explicadas anteriormente, sobre todo, en el momento que se detecta una gestación gemelar y evitar así pérdidas económicas al productor.

3. OBJETIVOS

Dada la singularidad de esta enfermedad, debido a su carácter especial de presentación y a las pérdidas económicas que puede generar en una explotación bovina, he decidido realizar esta revisión con el fin de comprender de una manera más profunda los diferentes aspectos de la misma.

El objetivo general del trabajo fue conocer y analizar la información más relevante y actualizada a partir de literatura reciente relacionada con el síndrome de Freemartin. Para ello se tuvieron en cuenta:

- Información general sobre la enfermedad, descripción e historia.
- Etiopatogenia y cuadro clínico más común.
- Métodos de diagnóstico más frecuentes.
- Repercusiones económicas.

También quiero hacer constar que me he centrado en la etiología de la enfermedad, más concretamente en la revisión de estudios realizados por diversos autores acerca de las teorías del origen de dicha patología.

4. METODOLOGÍA

La metodología a seguir fue realizar una revisión bibliográfica sobre avances en el estudio de la patología y verificar el interés sobre este tema por parte de sus autores.

Realizado mediante la búsqueda bibliográfica de información en las bases de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) , ResearchGate (<https://www.researchgate.net>), diversos libros y artículos científicos a nivel nacional e internacional. También en revistas científicas como es el caso de Anembe y Revista Frisona Española.

Software de gestión de bibliografía, Mendeley y Zotero.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cada vez existen más herramientas para diagnosticar este tipo de anomalías. La utilización de secuencias específicas del cromosoma Y, y algunas secuencias nucleotídicas de los cromosomas sexuales X/Y, han permitido identificar la presencia de quimerismo y aneuploidías de los cromosomas sexuales.

Mediante la técnica de la PCR ahora es posible la amplificación en bovinos de los genes ZFX/ZFY, que son identificados mediante un polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP).

Long (1990) reporta el nacimiento de hembras estériles en el 92% de los casos de bovinos con gestación múltiple heterosexual en las que ocurre fusión corion-alantoides y anastomosis de los vasos sanguíneos, lo que significa que el 8% restante corresponde a las terneras gemelas nacidas de parto heterosexual en las que no ocurre fusión placentaria y por consiguiente no presentan citológicamente quimerismo leucocitario.

Este porcentaje (8%) de animales debe tener su capacidad reproductiva normal, si no existe otra causa y en la práctica podrían estar siendo descartadas por el solo hecho de ser terneras gemelas nacidas de parto heterosexual. Por ello, cabe destacar la importancia que puede tener el diagnóstico citológico temprano del *freemartinismo* a través del análisis cromosómico, el cual se puede realizar desde el mismo día del nacimiento (Jiménez y Sánchez, 1999).

La incidencia de partos gemelares en ganaderías lecheras oscila entre un 2.2 y un 6.9% en los últimos años, con una tendencia a incrementar con el paso del tiempo (Day et al., 1996; Kinsel et al., 1998).

En sistemas de producción cárnica los partos gemelares son considerados deseables, ya que el peso vivo total destetado por parto es mayor. Sin embargo, en sistemas de producción lechera las gestaciones gemelares generan pérdidas económicas estimadas entre 100 y 125 euros por parto (Eddy et al., 1991; Bereepoot et al., 1992).

En una revisión bibliográfica llevada a cabo por Hendy y Bowman en 1970, se reportó que las vacas con gemelos parían de entre 1.5 a 10 días antes que sus compañeras de rebaño. Las gestaciones más cortas pueden ser resultado de un incremento en las demandas nutricionales y/o mecanismos hormonales (Hendy y Bowman, 1970; Nielen et al. 1989). Una de las consecuencias derivadas de esta situación es una reducción en el número de días en el que las vacas se pueden beneficiar de estrategias de manejo tales como la dieta de transición. También se ha especulado que gestaciones más cortas pueden incrementar el riesgo de retención de placenta (Eddy et al., 1991).

La incidencia de metritis también es mayor en partos gemelares, así después de parir gemelos un 27.0 – 31.7% de las vacas presentaron secreciones vulvares anormales o precisaron lavados con antibióticos, frente a un 7.0 – 7.5% en partos simples (Nielen et al., 1989; Eddy et al., 1991).

Las vacas madres de gemelos son más susceptibles de padecer enfermedades metabólicas y del periparto que sus compañeras de rebaño, además el intervalo entre partos se alarga entre 2 y 3 semanas. Todo esto sumado apunta como posible explicación de la reducción en la fertilidad de estas madres (Eddy et al., 1991).

Los efectos negativos observados en crías y madres después de gestaciones gemelares hacen que este sea un fenómeno económicamente importante para la industria lechera. Más investigación deberá llevarse a cabo para determinar la fisiología detrás de gestaciones gemelares con la intención de prevenirlas y/o para desarrollar nuevas estrategias de manejo que mitiguen las consecuencias negativas de este evento cada vez más frecuente en nuestras granjas. (Silva del Río, 2006).

6. CONCLUSIONES

El *freemartinismo* se presenta debido al tipo de placentación de los rumiantes, pues para que esta patología se dé es necesario que se produzca una doble ovulación y/o la entrada de dos espermatozoides en un mismo óvulo, y una fertilización que lleve a la generación de embriones de diferente sexo; durante el desarrollo embrionario se establece la unión de las placentas de los gemelos y con esto se produce la circulación sanguínea común que conlleva a la masculinización de la hembra y a anomalías fisiológicas en la reproducción del macho.

Tanto los cambios anatómicos y celulares en estos individuos han hecho posible la aplicación de diversos métodos diagnósticos para la identificación de los animales *freemartin*.

Estas pruebas incluyen la evaluación anatómica, serológica y citogenética. Con los avances en la biotecnología molecular en la actualidad se utilizan técnicas más sensibles, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación *in situ* por fluorescencia, estas técnicas son exactas y se pueden realizar desde el día del parto lo cual es de gran importancia para poder descartar los animales de forma temprana.

Todas estas técnicas y avances científicos permiten detectar antes estos animales *freemartins* y poder desecharlos, evitando así pérdidas económicas para el productor. Este factor es importante, sobre todo, en explotaciones lecheras donde se mantienen hembras que nunca serán reproductoras y se generan grandes gastos sin obtener beneficios.

Mientras no dispongamos de información concluyente para establecer los factores que determinan las gestaciones gemelares será difícil intervenir sobre este factor de fertilidad, aunque el conocimiento de la cascada de problemas asociados nos permitirá adoptar el conjunto de medidas necesarias con tal de minimizar los riesgos (Senger, 2005).

6.1. CONCLUSIONS

Freemartinism arises due to placental type of ruminants. For this pathology is needed double ovulation and / or entry of two sperm into a single ovule, and fertilization leading to the generation of embryos of different sex; during embryonic development the union of the placentas of twins is established and thus the common blood circulation leading to the masculinization of the female and physiological abnormalities in male reproduction occurs.

Both anatomical and cellular changes in these individuals have made possible the application of several diagnostic methods for identification of freemartin animals.

These tests include anatomical, serological and cytogenetic evaluation. With advances in molecular biotechnology at present more sensitive techniques are used, including polymerase chain reaction and in situ hybridization by fluorescence, these techniques are accurate and can be done from the day of delivery which is very important to rule out animals early.

All these techniques and scientific advances detect these freemartin animals before to discard them, avoiding economic losses for producers. This is important, especially in dairy farms where there are females that will never be breeding females and big expenses are generated without any profit.

While we do not have conclusive information to establish the factors that determine twin gestations it will be difficult to speak on this factor fertility, although the knowledge of the cascade of associated problems will allow us to take the set of necessary measures to minimize the risks (Senger, 2005).

7. VALORACIÓN PERSONAL

Personalmente la realización del trabajo de fin de Grado me ha permitido aprender a utilizar distintas bases de datos científicas, sabiendo dónde y cómo realizar una búsqueda de bibliografía; además de obtener un conocimiento global y más preciso de la patología en concreto.

Ahora tengo conocimientos más precisos y amplios para saber identificar un animal *freemartin*, saber la patogenia y las diferentes pruebas diagnósticas que existen para detectarlos y evitar así una pérdida económica al productor, si algún día me encuentro ante esta situación.

Una posible propuesta sería introducir la utilización de las técnicas de diagnóstico tal como la PCR de manera más rutinaria en las explotaciones, sobre todo, cuando se presente una gestación gemelar y poder diagnosticar antes animales *freemartin* evitando así pérdidas económicas para el productor.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, M.A., Villagómez, D., Galindo, J., Sánchez, D., Ávila, D. y Guerrero, L. 2007. Estudio anatomopatológico, citogenético y molecular del síndrome freemartin en el bovino doméstico (*Bos taurus*). REDVET. Vol 8, 2007.
- Beerepoot G. M., Dykhuizen, A.A. , Nielen, M. and Schukken, Y.H. 1992. The economics of naturally occurring twinning in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 75:1044-1051.
- Brace, M.D., Peters, O., Menzies, P., King, W.A. and Nino-Soto, M.I. 2008. Sex chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep. *Cytogenet Genome Research*. 120:132-139.
- Day J.D., Leon, D.W., and Franti, C.E. 1995. Twin pregnancy diagnosis in Holstein cows: discriminatory powers and accuracy of diagnosis by transrectal palpation and outcome of twin pregnancies. *Canadian Veterinary Journal*. 36:93-97.
- Eddy, R. G., Davies, O. and David, C. 1991. An economic assessment of twin births in British dairy herds. *Veterinary Records*. December 14;129(24):526-529.
- Foster, R.A. 2000. Esterilidad de las terneras nacidas de parto gemelar con un ternero (Síndrome Freemartin). ABS México. Artículos técnicos.
- Fricke P.M., Guenther, J.N., and Wiltbank, M.C. 1998. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 50:1275-1284.
- Giannelli, F. 1970. Human Chromosomes DNA Synthesis- Monographs- Karger, S. Human Genetic. No 5. ; p.601-604.
- Greene, W.A., Dunn, H.O., and Foote, R.H. 1977. Sex-chromosome ratios in cattle and their relationship to reproductive development in freemartins. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 18: 97-105.

- Hendy, C.R. and Bowman, J.C. 1970. Twinning in cattle. *Animal Breeding Abstracts* 38:22-37.
- Hinrichs, K., Buoën, L.C., and Ruth, G. 1999. XX/XY chimerism and freemartinism in a female llama co-twin to a male. *Scientific Record*. 215: 1140- 1141.
- Hunter R.H. 1995. Sex determination differentiation and intersexuality in placental mammals. Cambridge. University press. p. 310.
- Jainudeen, M.R. and Hafez, E.S. 1965. Attempts to induce bovine freemartinism experimentally. *Journal of Reproduction and Fertility*. 10: 281-283.
- James, F. and Dove, F.W. 1996. Cattle twins and immune tolerance. *Genetics*. 144: 855-859.
- Jiménez, L.M. 2000. La citogenética en medicina veterinaria. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, FMVZ, Laboratorio de citogenética.
- Jiménez, L.M., y Sánchez, C.A. 1999. Utilidad de la evaluación citogenética para el diagnostico temprano del Freemartin. *Veterinaria al día*. 8: 27-29.
- Jost, A.M., Chodkiewicz, M. and Mauleon, P. 1963. Intersesualité du foetus de veau produite par des androgenes. Comparaison entre l=hormone foetale responsable du free-martinisme et l=hormone testiculaire adulte. C.R. Hebd.Seances Academy Science. 256: 274-276.
- Kinsel, M. L., Marsh, W.E., Ruegg, P.L., and Etherington, W.G. 1998. Risk factors for twinning in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 81:989-993.
- Llambí, S. 2005. Blog sobre enfermedades hereditarias en rumiantes.
http://enfermedadeshereditariasderumiantes.blogspot.com.es/2005/06/freemartinismo-en-bovinos_28.html. [homepage on the Internet].

- Long, S.E. 1990. Development and diagnosis of freemartinism in cattle. Practice 12:208-210.
- López, J. B., Márquez, M.E. and Hoyos, D. 1997. Cariotipo Citogenético de la guagua (*Agoutí paca*). Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín. 50 (2): 5-18.
- Lui, J., Tonhttt, H., Tosta, P.A., Giannoni, M.A., Giannoni, M.L. 1987. Subfertilidade e esterilidade em bovinos holandeses com aberrações cromosômicas numéricas e estruturais. Ars Veterinari. 3: 227-234.
- Lyon, L.A. 1995. The Causes and effects of freemartinism cattle. Amstrong, J. y Beniot, A. Reproduction, lactation and behavior of domestic animals. 277: 21-40.
- Makinen, A. 1974. Chimerism in a bull calf. Hereditas, 76: 154-156.
- Marcum, J. B. 1974. The freemartin syndrome. Animal Breeding Abstracts. 42: 227-242.
- Mason, R.W., Bone, J.F., Bogart, R. and Krueger, H. 1958. Urogenital anomalies in a calf born to beef cow treated with testosterone during pregnancy. Journal of Pharmacology. 122:49-50.
- Michel, G. and Schwarte, E. 1970. Compendio de Anatomía Veterinaria-Embriología. 1ed. Barcelona: Acribia. Tomo VI.
- Moncaleano, J.S., Jiménez, L.M. y Sánchez, C.A. 2006. Quimerismo leucocitario en hembras bovinas nacidas de parto gemelar heterosexual. Orinoquia 10 N° 2.
- Moorhead, P.S. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. Experiment Cell Research. 210:613-616.
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J.L, Jiménez, A., González, A., and Ferrús, M.A. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. Water Research. 41:3490-3496.

- Nielen, M., Schukken, Y.H., Scholl, D.T., Wilbrink, H.J, and Brand, A. 1989. Twinning in dairy cattle: A study of risk factors and effects. *Theriogenology* 32:845–862.
- Noden, D.M. 1990. Embriología de los animales domésticos. Acribia Editorial. 386-387.
- Padula, A.M. 2005. The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science* 87: 93-109.
- Peretti, V., Ciotola, F., Albarella, S., Paciello, O., Dario, C., Barbieri, V., and Iannuzzi, L. 2008. XX/XY chimerism in cattle: clinical and cytogenetic studies. *Sexual Development*. 2: 24-30.
- Petrizzi, L., Varasano, V., and Robbe, D. 2002. Urethral hypoplasia with bladder rupture in a newborn bovine freemartin. *Veterinary Record Research*. 151:60-61.
- Rice, V.A., Andrews, F.N., Warwick, E. J. and Legates, J. 1970. Breeding and improvement of farm animals. Ed. McGraw Hill, New York.
- Rodríguez, R. 2013. Le free-martin. http://raymond.rodriquez1.free.fr/Documents/TP/1s31tp2/free_martin.htm. [homepage on the Internet].
- Salamanca, F. 1992. Trastornos genéticos de la diferenciación sexual en el humano. *Gaceta Médica de México*, 128:57-79.
- Salisbury, V.D and Lodge, J.R. 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Ed. Freeman and Company, San Francisco.
- Senger, P.L. 2005. Factores de fertilidad en el ganado lechero de alta producción- ¿Cuáles son realmente importantes? Planeta Semex. Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Washington.

- Silva del Río, N., Stewart, S., Rapnicki, P., Chang, Y.M., and Fricke, P.M. 2006. An observational analysis of twin births, calf sex ratio, and calf mortality in Holstein dairy cattle. *Journal Dairy Science* 88 (Suppl 1): 298.
- Valencia, F.J, Johnson, F. y Duque, A.M. 2009. Identificación anatómica, citogenética y molecular de un caso de síndrome de Freemartin. *Revista lasallista de investigación* 2 (2): 45-49.
- Virgier, B., Legeail, L., Bézard, J. and Josso, N. 1984. Origin anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 473-479.
- Wijeratne, W, Munro, I. and Wilkes, P. 1977. Heifer sterility associated whit singlebirth freemartinism. *The Veterinary Record*. 100: 333-336.